

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 11134:2015  
ISO 22174:2005**

**VI SINH VẬT TRONG THỰC PHẨM VÀ THỨC ĂN  
CHĂN NUÔI - PHẢN ỨNG CHUỖI POLYMERASE (PCR) ĐỂ  
PHÁT HIỆN VI SINH VẬT GÂY BỆNH TỪ THỰC PHẨM -  
ĐỊNH NGHĨA VÀ YÊU CẦU CHUNG**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Polymerase chain reaction (PCR)  
for the detection of food-borne pathogens -- General requirements and definitions*

**HÀ NỘI - 2015**

**Lời nói đầu**

TCVN 11134:2015 hoàn toàn tương đương với ISO 22174:2005;

TCVN 11134:2015 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13  
*Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo  
lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## **Lời giới thiệu**

PCR là phương pháp nhanh, có độ nhạy và độ đặc hiệu cao trong việc phát hiện các vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm. Mặc dù là đây là công nghệ tương đối mới, nhưng đang được ứng dụng nhiều trong phân tích thực phẩm.

Tóm lại, các nguyên tắc hiện hành có thể được chia thành hai nhóm chính, tùy thuộc vào kiểu axit nucleic được dùng làm đích để khuếch đại:

- Khuếch đại theo ARN (RT-PCR);
- Khuếch đại theo ADN (PCR).

Có nhiều biến đổi của hai phương pháp đã được thiết lập và có thể đặc trưng cho mức độ phức tạp của chúng và kỹ thuật tự động. Mức độ đặc hiệu của các phương pháp khác nhau từ các phép thử sàng lọc phát hiện các trình tự axit nucleic thông thường đến chỉ vi sinh vật, đến các phép thử đặc thù nhận biết thống nhất các trình tự axit nucleic đến chủng riêng biệt hoặc kiểu trình tự axit nucleic đặc hiệu.

Tiêu chuẩn này đưa ra danh mục các yêu cầu đối với các phương pháp PCR được sử dụng để phát hiện các vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm. Tiêu chuẩn này đưa ra các thuật ngữ và định nghĩa được dùng trong PCR và RT-PCR.

Tiêu chuẩn này nằm trong bộ tiêu chuẩn với tên chung là *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm*:

TCVN 7682 (ISO 20838), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Yêu cầu về khuếch đại và phát hiện đối với các phương pháp định tính*

TCVN 10781 (ISO/TS 13136) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phương pháp phát hiện vi sinh vật gây bệnh trong thực phẩm bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) thời gian thực – Phát hiện Escherichia coli sinh độc tố Shiga (STEC) và xác định các nhóm huyết thanh O157, O111, O26, O103 và O145*

TCVN 11131 (ISO/TS 20836), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Phép thử hiệu năng đối với máy chu trình nhiệt*

TCVN 11132 (ISO 22118) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện và định lượng vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Đặc tính hiệu năng*

TCVN 11133 (ISO 22119), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase real-time (PCR real-time) để phát hiện và định lượng vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Định nghĩa và yêu cầu chung*

TCVN 11134 (ISO 22174), *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Định nghĩa và yêu cầu chung*

ISO 20837, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Requirements for sample preparation for qualitative detection* [*Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Yêu cầu về chuẩn bị mẫu để phát hiện định tính*].

## **Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi - Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm - Định nghĩa và yêu cầu chung.**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – General requirements and definitions*

**CẢNH BÁO** – Khi áp dụng tiêu chuẩn này có thể liên quan đến các vật liệu, thiết bị và các thao tác gây nguy hiểm. Tiêu chuẩn này không đưa ra được hết tất cả các vấn đề an toàn liên quan đến việc sử dụng chúng. Người sử dụng tiêu chuẩn này phải tự thiết lập các thao tác an toàn thích hợp và xác định khả năng áp dụng hoặc các giới hạn quy định trước khi sử dụng tiêu chuẩn.

### **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này đưa ra các yêu cầu chung để khuếch đại *in vitro* các trình tự axit nucleic (ADN hoặc ARN). Tiêu chuẩn này có thể áp dụng để phân tích thực phẩm và các chủng sinh được phân lập từ thực phẩm sử dụng phản ứng chuỗi polymerase (PCR).

Các yêu cầu tối thiểu được quy định trong tiêu chuẩn này được sử dụng để đảm bảo thu được các kết quả so sánh và kết quả tái lập trong các phòng thử nghiệm khác nhau.

Tiêu chuẩn này đã được thiết lập đối với các vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm hoặc các chủng phân lập từ thực phẩm và thức ăn chăn nuôi, tiêu chuẩn này cũng có thể áp dụng cho các nền mẫu khác (ví dụ: các mẫu môi trường) và để phát hiện các vi sinh vật không gây bệnh.

### **2 Tài liệu viện dẫn**

Các tài liệu viện dẫn sau là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi (nếu có).

## TCVN 11134:2015

TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung.*

TCVN 7682 (ISO 20838) *Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) để phát hiện sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Yêu cầu về khuếch đại và phát hiện đối với các phương pháp định tính.*

TCVN 8244-1 (ISO 3534-1), *Thống kê học – Từ vựng và ký hiệu – Phần 1: Thuật ngữ chung về thống kê và thuật ngữ dùng trong xác suất.*

ISO 20837, *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Requirements for sample preparation for qualitative detection [Vi sinh vật trong thực phẩm và thức ăn chăn nuôi – Phản ứng chuỗi polymerase (PCR) để phát hiện vi sinh vật gây bệnh từ thực phẩm – Yêu cầu về chuẩn bị mẫu để phát hiện định tính].*

### 3 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau. Đối với các định nghĩa liên quan đến đánh giá xác nhận, xem TCVN 8244-1 (ISO 3534-1) và TCVN 6910-1 (ISO 5725-1).

#### 3.1 Thuật ngữ chung

##### 3.1.1

**Axit nucleic** (nucleic acid)

Đại phân tử cung cấp thông tin di truyền hoặc hoạt động như một chất biểu hiện thông tin.

CHÚ THÍCH: Có hai loại axit nucleic: ADN và ARN.

##### 3.1.2

**ADN (DNA)**

**Axit deoxyribonucleic** (deoxyribonucleic acid)

Polyme của deoxyribonucleotid ở dạng sợi đôi (dsADN) hoặc dạng mạch đơn thẳng (ssADN).

##### 3.1.3

**ARN (RNA)**

**Axit ribonucleic** (ribonucleic acid)

Polyme của ribonucleotid trong dạng mạch đôi hoặc dạng mạch đơn thẳng.

##### 3.1.4

**Nền mẫu** (matrix)

Các sản phẩm để phân tích, có thể có các thành phần hóa học và trạng thái vật lý khác nhau.

**3.1.5****Điều kiện lặp lại (repeatability condition)**

Điều kiện mà tại đó các kết quả thử nghiệm độc lập nhận được với cùng một phương pháp, trên những mẫu thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thí nghiệm, bởi cùng người thao tác, sử dụng cùng một thiết bị, trong khoảng thời gian ngắn.

[ISO 3534-1].

**3.1.6****Điều kiện tái lập (reproducibility condition)**

Điều kiện mà trong đó các kết quả thử nghiệm nhận được bởi cùng một phương pháp, trên các mẫu thử giống hệt nhau trong các phòng thí nghiệm khác nhau, với những người thao tác khác nhau, sử dụng các thiết bị khác nhau.

[ISO 3534-1].

**3.1.7****Phát hiện (detection)**

Công nhận sự có mặt của axit nucleic đích.

**3.1.8****Giới hạn phát hiện (LOD) (detection limit/limit of detection) (LOD)**

Hàm lượng tối thiểu hoặc nồng độ tối thiểu của vi sinh vật đích trong một lượng nền mẫu xác định có thể phát hiện được trong các điều kiện thực nghiệm quy định trong phương pháp.

**3.1.9****Nhận biết (identification)**

Quá trình xác định chủng phân lập thuộc một trong các chủng cần tìm.

**3.2 Thuật ngữ liên quan đến tách chiết và tinh sạch ADN/ARN****3.2.1****Chiết axit nucleic (nucleic acid extraction)**

Xử lý mẫu thử để giải phóng axit nucleic đích.

**3.2.2****Tinh sạch axit nucleic (nucleic acid purification)**

Phương pháp tạo ra ADN tinh sạch hơn.

**CHÚ THÍCH** Trong trường hợp này, tinh sạch là giảm bớt các ảnh hưởng có thể quan sát thấy của các chất ức chế phản ứng PCR trên các phép kiểm soát ức chế PCR.

## **TCVN 11134:2015**

### **3.2.3**

#### **ADN có chất lượng cho phản ứng PCR (PCR quality DNA)**

Khuôn mẫu ADN có độ dài và số lượng phù hợp cho PCR.

### **3.2.4**

#### **ARN có chất lượng cho phản ứng RT-PCR (RT-PCR quality RNA)**

Khuôn mẫu ARN có độ dài và số lượng phù hợp cho phiên mã ngược và PCR.

## **3.3 Thuật ngữ liên quan đến phiên mã ngược của ARN đến ADN**

### **3.3.1**

#### **RT (RT)**

##### **Phiên mã ngược (reverse transcription)**

Tổng hợp ADN từ khuôn mẫu ARN sử dụng enzym phiên mã ngược kết hợp với mỗi RT trong sự có mặt của deoxyribonucleoside triphosphat.

### **3.3.2**

##### **Enzym phiên mã ngược (reverse transcriptase)**

Enzym xúc tác phiên mã ngược ARN thành ADN sử dụng các môi RT.

### **3.3.3**

##### **Ribonuclease (ribonuclease)**

Enzym làm phân hủy ARN.

### **3.3.4**

##### **Chất ức chế ribonuclease (ribonuclease inhibitor)**

Chất làm bất hoạt ribonuclease.

### **3.3.5**

##### **Môi RT (RT-primer)**

Môi được sử dụng trong phiên mã ngược.

### **3.3.6**

##### **Hỗn hợp RT (RT mix)**

Hỗn hợp thuốc thử dùng trong phiên mã ngược.

### **3.3.7**

##### **Deoxyribonucleoside triphosphat (deoxyribonucleoside triphosphate)**

##### **dNTP (dNTP)**

Dung dịch chứa aATP, dCTP, dGTP, dTTP và/hoặc dUTP.



### 3.4 Thuật ngữ liên quan đến khuếch đại ADN bằng PCR/RT-PCR

#### 3.4.1

**Phản ứng chuỗi polymerase** (polymerase chain reaction)

**PCR (PCR)**

Quy trình enzym cho phép khuếch đại *in vitro* ADN.

#### 3.4.2

**RT-PCR (RT-PCR)**

Phương pháp gồm có hai phản ứng, phiên mã ngược (RT) của ARN thành ADN và chạy PCR.

#### 3.4.3

**RT-PCR một bước** (one step RT-PCR)

Phương pháp kết hợp phiên mã ngược (RT) ARN thành ADN và PCR trong một phản ứng đơn lẻ.

#### 3.4.4

**RT-PCR hai bước** (two-step RT-PCR)

Phương pháp bao gồm phiên mã ngược (RT) và PCR trong hai phản ứng riêng rẽ.

CHÚ THÍCH: RT-PCR hai bước có thể được thực hiện liên tiếp trong một ống đơn hoặc trong hai ống khác nhau.

#### 3.4.5

**Sản phẩm PCR** (PCR product)

ADN được khuếch đại bằng PCR.

#### 3.4.6

**Phát hiện sản phẩm PCR** (detection of PCR product)

Quá trình nhận tín hiệu về sự có mặt của sản phẩm PCR.

#### 3.4.7

**Khẳng định sản phẩm PCR** (confirmation of PCR product)

Quá trình chứng minh sản phẩm PCR có nguồn gốc từ trình tự đích.

#### 3.4.8

**PCR-ELISA (PCR-ELISA)**

Phương pháp phát hiện các sản phẩm PCR trong pha lỏng sau thời gian lưu của chúng trên pha rắn, như trong các giếng của đĩa nhiều giếng.

CHÚ THÍCH: Sự có mặt của các sản phẩm PCR được quan sát bằng việc phát hiện enzym miễn dịch tiếp theo và lai.

#### 3.4.9

**PCR khởi động nóng** (hot-start PCR)

Hoạt hóa polymerase ADN chịu nhiệt bằng bước làm nóng ban đầu để tránh khuếch đại không đặc hiệu.

## **TCVN 11134:2015**

### **3.4.10**

#### **PCR lồng (nested PCR)**

PCR khuếch đại trình tự trong sản phẩm PCR đầu tiên.

### **3.4.11**

#### **PCR đa mồi (multiplex PCR)**

Phản ứng PCR sử dụng nhiều cặp mồi.

### **3.4.12**

#### **Mồi (primer)**

Oligonucleotid có chiều dài xác định và trình tự bổ sung cho một đoạn trình tự ADN cần phân tích có liên quan.

CHÚ THÍCH: Mồi giống như trình tự ADN đích.

### **3.4.13**

#### **ADN đích (DNA target)**

Trình tự ADN được chọn để khuếch đại.

### **3.4.14**

#### **Biến tính (denaturation)**

Quá trình tách ADN sợi kép thành ADN sợi đơn.

### **3.4.15**

#### **Bắt cặp (annealing)**

Việc gắn kết mồi vào trình tự axit nucleic bổ sung trong các điều kiện quy định.

### **3.4.16**

#### **Kéo dài mồi (primer extension)**

Phản ứng enzym để tổng hợp sợi ADN mới bằng cách thêm các deoxyribonucleotid đơn lẻ vào đầu 3' của trình tự mồi.

### **3.4.17**

#### **ADN polymerase dùng cho PCR (ADN polymerase for PCR)**

Enzym bền nhiệt xúc tác tổng hợp ADN lặp lại.

### **3.4.18**

#### **Hỗn hợp gốc (mastermix)**

Hỗn hợp thuốc thử dùng cho PCR, không dùng cho ADN đích và các phép kiểm chứng.

### **3.4.19**

#### **UGN (UGN)**

#### **Uracil N-glycosylat (uracil N-glycosylate)**

Enzym để cắt mọi trình tự axit nucleic có chứa deoxyuridine (dUTP) tại vị trí của nucleotid đó.

**3.4.20****Máy chu trình nhiệt (thermal cycler)**

Thiết bị tự động thực hiện các chu trình gia nhiệt và làm nguội cần thiết cho PCR.

**3.4.21****Phân tích điểm kết thúc (endpoint analysis)**

Phân tích định tính để phát hiện các sản phẩm PCR.

**3.4.22****Phân tích thời gian thực (real time analysis)**

Phương pháp phát hiện các sản phẩm PCR trong quá trình khuếch đại.

**3.5 Thuật ngữ liên quan đến kiểm soát****3.5.1****Kiểm soát quá trình dương tính (positive process control)**

Mẫu được bổ sung các vi sinh vật đích, cần được xử lý theo cùng cách như xử lý mẫu thử.

**3.5.2****Kiểm soát quá trình âm tính (negative process control)**

Mẫu không chứa sinh vật gây bệnh đích của nền mẫu thực phẩm được chạy qua tất cả các giai đoạn của quá trình phân tích.

CHÚ THÍCH: Quá trình này có thể bao gồm chuẩn bị mẫu, làm giàu, tách chiết ADN và khuếch đại đích.

**3.5.3 Kiểm soát khuếch đại****3.5.3.1****Kiểm soát khuếch đại bên trong (internal amplification control)**

ADN được bổ sung vào mỗi phản ứng với một lượng hoặc một số lượng bản sao xác định dùng để kiểm soát bên trong của việc khuếch đại.

**3.5.3.2****Kiểm soát khuếch đại bên ngoài (external amplification control)**

Kiểm soát ADN bổ sung vào một lượng axit nucleic chiết được với một lượng hoặc một số lượng bản sao xác định dùng để kiểm soát khuếch đại trong một phản ứng riêng biệt.

**3.5.4****Kiểm soát tách chiết âm tính (negative extraction control)****Mẫu chiết trắng (extraction blank)**

Việc kiểm soát thực hiện trong tất cả các bước của quy trình tách chiết ADN khi không có mặt mẫu thử.

## **TCVN 11134:2015**

### **3.5.5**

#### **Kiểm chứng PCR dương tính (positive PCR control)**

Phản ứng chứa ADN đích trong một lượng hoặc số lượng bản sao xác định.

### **3.5.6**

#### **Kiểm chứng PCR âm tính (negative PCR control)**

Phản ứng thực hiện với nước không chứa ADN, không chứa chất ức chế PCR.

## **3.6 Thuật ngữ liên quan đến mẫu dò**

### **3.6.1**

#### **Mẫu dò ADN (DNA probe)**

Phân tử axit nucleic dán nhãn có trình tự xác định được sử dụng để phát hiện ADN đích bằng cách lai.

### **3.6.2**

#### **Thuốc thử hãm (blocking agent)**

Hợp chất được sử dụng để làm bão hòa các vị trí liên kết không đặc hiệu còn sót lại của pha rắn trước và trong quá trình lai với mẫu dò ADN.

### **3.6.3**

#### **Lai (hybridization)**

Sự liên kết đặc hiệu của các trình tự axit nucleic bổ sung trong các điều kiện phản ứng thích hợp.

### **3.6.4**

#### **Tính đặc hiệu (specificity)**

Khả năng nhận biết duy nhất cần phát hiện, phân biệt rõ ràng đích với các chất và các tạp chất tương tự.

## **4 Nguyên tắc**

### **4.1 Yêu cầu chung**

Việc kiểm tra bao gồm các bước liên tiếp sau đây:

- a) làm giàu các vi sinh vật ban đầu của vi sinh vật gây bệnh từ mẫu thử, nếu cần (xem 4.2);
- b) tách chiết axit nucleic và tinh sạch, nếu cần (xem 4.3);
- c) khuếch đại trình tự axit nucleic bằng PCR sử dụng các môi đặc hiệu (xem 4.4);
- d) phát hiện các sản phẩm PCR đặc hiệu (xem 4.5).

## 4.2 Làm giàu vi sinh vật ban đầu

Nếu cần, tăng số lượng tế bào sinh vật gây bệnh từ thực phẩm được phát hiện bằng cách kích thích phát triển các vi sinh vật đích trong mẫu trong môi trường dinh dưỡng lỏng chọn lọc hoặc không chọn lọc.

CHÚ THÍCH: Đối với virus, có sẵn các kỹ thuật khác như lọc và/hoặc cô đặc.

## 4.3 Chuẩn bị axit nucleic

Các tế bào vi sinh vật có trong mẫu thử hoặc trong giống cấy đã làm giàu được thủy giải để giải phóng các ADN. Nếu cần, bước tách được bổ sung trước thủy giải và/hoặc bước tinh sạch được thực hiện sau khi thủy giải.

## 4.4 Khuếch đại PCR

Các trình tự axit nucleic đặc hiệu được khuếch đại bằng PCR. Phản ứng là quá trình theo chu kỳ gồm ba bước sau:

- a) biến tính axit nucleic sợi đôi (dADN)
- b) mồi bắt cặp vào trình tự đích bổ sung;
- c) kéo dài mồi đã gắn bằng ADN polymerase chịu nhiệt.

ARN có thể phát hiện được bằng PCR nếu đích đầu tiên đã được phiên mã thành một ADN bản sao (cADN) bằng phiên mã ngược.

CHÚ THÍCH 1: Sau biến tính ADN sợi đôi, hai cặp mồi oligonucleotid sẽ bắt cặp với đoạn ADN đích cần khuếch đại. Các mồi định hướng ngược nhau theo hướng của chúng với trình tự đích.

CHÚ THÍCH 2: Các vùng sợi kép được hình thành là kết quả của cặp base đặc hiệu giữa các mồi và trình tự đích bao quanh đoạn ADN cần khuếch đại và là các vị trí khởi động để tổng hợp ADN bằng cách sử dụng ADN polymerase chịu nhiệt.

CHÚ THÍCH 3: Quá trình lặp lại của việc biến tính nhiệt, bắt cặp mồi và tổng hợp ADN (các chu trình) dẫn đến việc khuếch đại số mũ đoạn ADN được bao quanh bởi các mồi.

## 4.5 Phát hiện và khẳng định các sản phẩm PCR

Các sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di gel hoặc phương pháp thích hợp khác.

Việc nhận biết các sản phẩm PCR được khẳng định lại bằng phương pháp thích hợp, nếu cần.

## 5 Vật liệu thử nghiệm

Mọi loại thực phẩm hoặc thức ăn chăn nuôi đều thích hợp làm vật liệu thử, với điều kiện là dung dịch axit nucleic được chuẩn bị từ mẫu không ức chế PCR.

## 6 Yêu cầu chung đối với phòng thử nghiệm

### 6.1 Yêu cầu chung

Việc nhiễm bản ADN ngẫu nhiên có thể bắt nguồn từ bụi và phân tán sol khí. Do đó, việc tổ chức khu vực làm việc trong phòng thử nghiệm và thực hành phòng thử nghiệm tốt cần:

- a) ngăn chặn có hệ thống về các bước phương pháp luận liên quan đến việc thu được các kết quả
- b) theo nguyên tắc "một chiều" để xử lý mẫu.

Các biện pháp này đảm bảo rằng ADN trong vật liệu thử nghiệm và ADN khuếch đại được tạo ra bởi PCR giữ nguyên tính chất vật lý riêng rẽ.

### 6.2 Nhân sự

Tất cả mọi người tham gia vào quá trình thử nghiệm phải được đào tạo về kỹ thuật PCR và vi sinh vật.

Phải mặc các bộ áo bảo hộ khác nhau trước và sau khi chạy PCR. Sử dụng găng tay dùng một lần khi chuẩn bị mẫu và khi chạy PCR. Áo choàng và găng tay phòng thử nghiệm phải thay đổi định kỳ.

### 6.3 Bố trí phòng thử nghiệm

#### 6.3.1 Yêu cầu chung

Để tránh nhiễm bản hỗn hợp phản ứng bởi các trình tự đích được khuếch đại trước đó, cần đảm bảo rằng có sẵn các khu vực làm việc tách biệt với đầy đủ thiết bị, dụng cụ.

#### 6.3.2 Khu vực làm việc và thiết bị làm việc

Có ít nhất bốn khu vực làm việc chuyên dụng riêng rẽ và thiết bị làm việc cần thiết:

- a) khu vực làm việc để chuẩn bị dung dịch axit nucleic từ mẫu thử;
- b) khu vực làm việc để chuẩn bị hỗn hợp gốc;
- c) khu vực làm việc để bổ sung dung dịch axit nucleic đã chuẩn bị từ mẫu thử;
- d) khu vực làm việc để phát hiện và khẳng định các sản phẩm PCR.

Việc khuếch đại có thể được thực hiện trong khu vực làm việc c) hoặc khu vực làm việc d).

Nếu máy chu trình nhiệt được đặt trong khu vực làm việc c), thì các ống chứa các sản phẩm phản ứng khuếch đại không được mở trong khu vực làm việc c).

Phải sử dụng các bộ pipet khác nhau để chuẩn bị mẫu và chuẩn bị hỗn hợp gốc.

Cần thực hiện các thực nghiệm trong các điều kiện môi trường thích hợp.

Việc sử dụng các phòng khác nhau là hiệu quả nhất và là cách thích hợp để đảm bảo các khu vực làm việc và các thiết bị riêng biệt.

CHÚ THÍCH: Các sản phẩm PCR có thể bị phá hủy bởi dung dịch hypochloride 3 % khối lượng.

#### **6.4 Quản lý chất thải**

Cần sử dụng các quy trình quản lý chất thải và khử nhiễm thích hợp.

### **7 Thuốc thử**

Sử dụng các thuốc thử nêu trong ISO 20837 và TCVN 7682 (ISO 20838).

### **8 Thiết bị và dụng cụ**

#### **8.1 Yêu cầu chung**

Các phòng thử nghiệm cần sử dụng thiết bị được bảo dưỡng đúng cách theo hướng dẫn của nhà sản xuất và các yêu cầu nêu trong TCVN ISO/IEC 17025. Ngoài ra, các thiết bị phòng thử nghiệm chuẩn, dụng cụ quy định cụ thể được miêu tả trong các tiêu chuẩn cụ thể.

#### **8.2 Các xem xét đặc biệt**

Khi thích hợp, cần hiệu chuẩn thiết bị định kỳ nếu hiệu năng có ảnh hưởng đến kết quả.

### **9 Cách tiến hành**

#### **9.1 Chuẩn bị mẫu**

Thực hiện thủy giải tế bào, chuẩn bị axit nucleic và/hoặc tinh sạch mẫu thử theo phương pháp nêu trong ISO 20837.

#### **9.2 Khuếch đại**

Cho dung dịch axit nucleic vào hỗn hợp phản ứng và thực hiện các bước còn lại của PCR, sử dụng chương trình nhiệt độ/thời gian và số chu trình thích hợp đối với hệ thống môi và hỗn hợp phản ứng được sử dụng theo phương pháp. Việc không có mặt chất ức chế PCR phải được chứng minh bằng các phép kiểm chứng thích hợp.

#### **9.3 Kiểm chứng phản ứng**

Các phép kiểm chứng cần thiết để phát hiện các vi sinh vật gây bệnh bằng PCR nêu trong Bảng 1.

## TCVN 11134:2015

Các kiểm chứng PCR dương tính thích hợp (có mặt trình tự đích) và các phép kiểm chứng âm tính (không có mặt trình tự đích) phải bao gồm trong mỗi bước.

Các phép kiểm chứng cần được bổ sung trong các khoảng thời gian định kỳ và phải thường xuyên thực hiện nếu một trong các phép kiểm chứng khác không cho kết quả như mong đợi.

**Bảng 1 – Các phép kiểm chứng cần cho phân tích mẫu bằng PCR**

	Kiểm soát quá trình âm tính <sup>a</sup>	Kiểm soát quá trình dương tính <sup>a</sup>	Kiểm soát chiết âm tính <sup>b</sup>	Kiểm soát khuếch đại bên trong/ bên ngoài <sup>c</sup>	Kiểm soát PCR dương tính <sup>d</sup>	Kiểm soát PCR âm tính <sup>d</sup>
Xử lý mẫu	↓	↓				
Chiết axit nucleic	↓	↓	↓			
Khuếch đại	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Phát hiện	↓	↓	↓	↓	↓	↓

a Tần suất sử dụng phải được xác định như một phần của chương trình đảm bảo chất lượng của phòng thử nghiệm;

b Phép kiểm chứng này là không cần thiết khi đã thực hiện kiểm soát quá trình âm tính.

c Kiểm soát khuếch đại bên trong hoặc bên ngoài phải thực hiện với mỗi phản ứng PCR.

d Kiểm soát này cần đối với từng mẻ của mẫu trong chạy chu trình.

↓ Các quá trình bao gồm trong phép kiểm chứng này.

### 9.4 Khẳng định các kết quả PCR

Sự có mặt sản phẩm PCR và tính đặc hiệu của sản phẩm này phải được chứng minh bằng phản ứng khẳng định thích hợp (xem 4.5).

Kết quả PCR dương tính cũng có thể được khẳng định bằng phương pháp nuôi cấy.

## 10 Đánh giá

Có thể đánh giá nếu các kết quả thu được bằng các phép kiểm chứng quy định trong 9.3 là rõ ràng.

Các kết quả PCR dương tính và việc diễn giải các kết quả này được nêu trong Bảng 2.



Bảng 2 – Kết quả PCR

Mẫu thử	Kiểm soát quá trình dương tính	PCR dương tính	Kiểm soát quá trình âm tính Kiểm soát chiết âm tính Kiểm soát PCR âm tính	Kiểm soát khuếch đại bên trong	Kiểm soát khuếch đại bên ngoài	Diễn giải kết quả
+	+	+	-	+/-	+	Dương tính
-	+	+	-	+	+	Âm tính
+	+	+	+	+/-	+/-	Không kết luận <sup>a</sup>
-	-	+	-	-	-	Không kết luận <sup>b</sup>

+ Phát hiện được sản phẩm PCR  
 - Không phát hiện được sản phẩm PCR  
 a Có thể bị nhiễm  
 b Có khả năng bị ức chế.

## 11 Báo cáo kết quả

Báo cáo kết quả này phải tuân thủ các yêu cầu trong TCVN/ISO/IEC 17025 và phải bao gồm ít nhất các thông tin sau:

- mọi thông tin cần thiết về nhận biết mẫu thử;
- mọi chi tiết liên quan đến mẫu phòng thử nghiệm (ví dụ: cỡ không đủ, tình trạng suy giảm chất lượng);
- viện dẫn tiêu chuẩn được sử dụng để thử nghiệm và các phương pháp phải thực hiện;
- ngày nhận mẫu;
- các điều kiện bảo quản;
- ngày bắt đầu/ngày kết thúc phân tích;
- người thực hiện phân tích;
- cỡ mẫu thử;
- kết quả thử nghiệm;
- mọi điểm bất thường quan sát được trong quá trình thử nghiệm;
- mọi sai lệch, bổ sung hoặc giảm bớt so với quy định của phép thử và mọi thông tin liên quan đến phép thử đặc hiệu.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] SAMBROOK J., FRITSCH E.F. ADN MANIATIS T. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (ISBN: 0879693096)
-